Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.-A. Martini

Optimale Bedingungen für den ^{3}H-Thymidineinbau in Phythämagglutinin- und Tuberkulin-stimulierte menschliche Lymphozyten-Kulturen

- Der Einfluß adhärenter Zellen -

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Helga Treib, geb. Kallenbrunnen
aus Völklingen/Saar

Marburg 1979

Fotodruck Symon und Wagner OHG · 3550 Marburg · Biegenstraße 5

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.-A. Martini

Optimale Bedingungen für den ^{3}H-Thymidineinbau in Phythämagglutinin- und Tuberkulin-stimulierte menschliche Lymphozyten-Kulturen

- Der Einfluß adhärenter Zellen -

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Helga Treib, geb. Kallenbrunnen
aus Völklingen/Saar

Marburg 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 26. 1. 1979
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. K. Havemann
Coreferent: Prof. Dr. rer.nat. W. Ax

Optimale Bedingungen für den ^{3}H-Thymidineinbau in Phythämagglutinin- und Tuberkulin-stimulierte menschliche Lymphozyten-Kulturen

- Der Einfluß adhärenter Zellen -

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0051

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND HISTORISCHER ÜBERBLICK

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Trennung von Lymphozyten und adhärenten Zellen

2.2 Ansatz der Lymphozyten-Kulturen

2.3 Inkubation mit ^{3}H-Thymidin

2.4 Abbruch der Kulturen, DNA-Extraktion und Messung der Radioaktivität

3. RESULTATE

3.1 Sättigungsbedingungen in Phythämagglutinin-stimulierten Kulturen mit gereinigten Lymphozyten mit und ohne Zusatz adhärenter Zellen

3.2 Sättigungsbedingungen in Tuberkulin-stimulierten Kulturen mit gereinigten Lymphozyten mit und ohne Zusatz adhärenter Zellen

4. DISKUSSION

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

7. SCHLUSSWORT

8. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

9. LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG UND HISTORISCHER ÜBERBLICK

Für Untersuchungen auf dem Gebiet der theoretischen und klinischen Immunologie und Hämatologie ist die In-vitro-Lymphozytenstimulation durch unspezifische Mitogene (z.B. Phythämagglutinin, PHA), Antigene oder allogeneische Zellen von großer Bedeutung. In der Vergangenheit wurden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Methoden zur quantitativen Erfassung der Lymphozytenreaktion angewandt. Morphologische Kriterien zur Bestimmung der Lymphozytentransformation und -Proliferation erwiesen sich als nicht ausreichend geeignet, da die Ergebnisse durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflußt werden, was häufig die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigt (Schellekens und Eijsvoogel, 1968[17]).

1963 wurde von Michalowsky[12] und 1965 von Aisenberg[1] eine Methode zur Bestimmung der Lymphozytenproliferation beschrieben, die die Einbaurate von radioaktiv markiertem Thymidin in die Zellen als Maß für die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Synthese heranzieht. Es herrscht heute allgemein Übereinstimmung darüber, daß der Einbau von markiertem Thymidin die sicherste Methode zur Proliferationsbestimmung von weißen Blutzellen ist, da in vielen Versuchen, u.a. von Wolberg, 1971[20], bestätigt werden konnte, daß der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die Zellen mit der tatsächlichen DNA-Synthese korreliert.

Der Einbau markierter Nucleotide in die DNA ist jedoch verschiedenen Einflüssen unterworfen. Bisher sind eine Reihe von Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt worden, unter Berücksichtigung solcher beeinflussender Faktoren möglichst optimale Markierungsbedingungen für Leukozyten-, insbesondere für Lymphozyten-Kulturen zu entwickeln. Von besonderer Bedeutung scheint dabei der Anteil nicht lymphozytärer Zellen (Granulozyten, Monozyten) in der Kultur zu sein, die zum einen durch ihre Anwesenheit die lymphozytäre Reaktion erst ermöglichen und zum anderen durch ihre Fähigkeit zur Degradation von Thymidin die Einbaurate dieses Nucleotids erheblich beeinflussen.

Die wichtigsten Arbeiten der letzten Jahre sollen hier kurz wiedergegeben werden, um zu verdeutlichen, wie sehr die Ergebnisse bei den einzelnen Versuchsansätzen (Kulturzubereitungen, Mitogene, Isotope, Konzentration und spezifische Aktivität des markierten Nucleotids) von den Ausgangsbedingungen abhängen.

Hartog, Cline und Grodsky[6] untersuchten 1967 den Einfluß von PHA und gereinigtem Tuberkulin auf Kulturen von nicht separierten Blutleukozyten des Menschen (jeweils 3 ml Kulturflüssigkeit mit 10^6 Zellen/ml), die mit 1 µg/ml ^{14}C-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 30 mCi/mMol markiert wurden. Die Inkubation erfolgte bei den PHA-stimulierten Kulturen zum Maximum der Proliferation nach 60 - 72 Stunden am 3. bzw. 4. Tag. Als Inkubationszeit mit ^{14}C-Thymidin wurde ein Zeitraum von einer Stunde bzw. von 12 Stunden gewählt. Der Einbau nach 12stündiger Inkubation war zehnmal höher als nach einstündiger Inkubationszeit; insgesamt wurden nach 12 Stunden 19,5 % der zugefügten Aktivität eingebaut.

Mit steigender Thymidinkonzentration stieg der Thymidineinbau bis zu einer Gesamtkonzentration von 64 µg/Kultur an. Bei weiterer Erhöhung der Thymidinkonzentration verringerte sich dann die Einbaurate.

Bei der Stimulierung mit Tuberkulin wurde die Inkubation am 6. Tag unter denselben Bedingungen (12 Stunden Inkubationszeit) vorgenommen, da bekanntlich die Lymphozytenproliferation auf Antigene - verglichen mit unspezifischen Mitogenen (z.B. PHA) - deutlich verzögert einsetzt.

Bei Personen mit einer starken Antwort auf den Tuberkulin-Hauttest betrug die Einbaurate 20,1 % der insgesamt zugefügten Aktivität. Bei Personen

mit schwächerer Antwort auf den Hauttest wurden nur 6,7 bzw. 4,8 %, bei negativer Reaktion nur ein geringfügiger bzw. kein Einbau des markierten Materials gesehen.

Die Untersucher sind - im Gegensatz zu anderen Autoren - der Ansicht, daß nicht lymphozytäre Zellen in der Kultur wie polymorphkernige Leukozyten oder Monozyten von nicht entscheidender Bedeutung bei der Bestimmung des Einbaues von markiertem Thymidin in stimulierte Lymphozyten sind. Die Verringerung der Einbaurate bei höheren Konzentrationen von Thymidin stimmt mit den Beobachtungen von Xeros[21)] überein, der bei exzessiv hoher Zugabe von Thymidin eine Mitosehemmung gefunden hat.

Schellekens und Eijsvoogel[17] untersuchten die Transformation von Lymphozyten in PHA-stimulierten Zellkulturen, wobei aufgrund morphologischer Kriterien keine reproduzierbaren Ergebnisse zu erhalten waren. Als Methode zur Bestimmung der Proliferation von Lymphozyten wählten sie deshalb die Messung des Einbaues von radioaktiv markiertem Thymidin (^{14}C-Thymidin) in die DNA der Lymphozyten. Die Experimente wurden mit gereinigten Lymphozyten durchgeführt (4 ml Kulturmedium mit 750 000 Lymphozyten/ml, inkubiert mit 0,6 µCi ^{14}C-Thymidin mit der spezifischen Aktivität von 12,5 mCi/mMol); die Kulturen enthielten weniger als 4 % Granulozyten. Zum Vergleich wurden Versuche mit Kulturen unternommen, die Lymphozyten und Granulozyten im Verhältnis 1 : 2 (3×10^6 Lymphozyten und 6×10^6 Granulozyten) enthielten, was den Bedingungen in nicht gereinigten Leukozytenkulturen entspricht.

Untersucht wurden:

1) die Korrelation zwischen der von den Zellen inkorporierten Radioaktivität und der tatsächlich in der DNA vorhandenen Radioaktivität. Es konnte gezeigt werden, daß 90 % des inkorporierten radioaktiven Thymidins in der Tat in der DNA vorhanden war.

2) der Einfluß von verschiedenen Zellkonzentrationen. Die Autoren fanden eine lineare Beziehung zwischen der Zahl der Lymphozyten und dem Thymidineinbau, wenn die Konzentration an Zellen 3×10^6/4 ml nicht überstieg.

3) die Thymidin-Inkorporation zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ergab sich, daß die DNA-Synthese ihr Maximum zwischen der 48. und der 72. Stunde der Kultur erreicht.

4) der Einfluß verschieden langer Inkubationszeiten mit markiertem Thymidin: nach 48 Stunden Kulturdauer wurde das radioaktive Material für 8, 16 und 24 Stunden bzw. nach 56 und 64 Stunden Kulturdauer für 12 und 8 Stunden hinzugefügt.
Aus den Ergebnissen konnte geschlossen werden, daß die Inkorporation wenigstens für 24 Stunden linear war.

5) der Einfluß der Thymidin-Konzentration auf die Inkorporation.
Der Abbau von Thymidin zu Thymin und Dihydrothymin, welche nicht in die DNA eingebaut werden, war ohne Einfluß auf die Inkorporation, wenn die Gesamtkonzentration an Thymidin nicht weniger als 2,9 µg/ml bei einer spezifischen Aktivität von 12,5 mCi/mMol betrug.

6) der Einfluß von in den Kulturen anwesenden Granulozyten.
Die Thymidin-Inkorporation in Zellkulturen mit einem Verhältnis von Lymphozyten zu Granulozyten von 1 : 2 unterschied sich zwischen der 48. und der 72. Stunde nicht signifikant von derjenigen in gereinigten Lymphozyten-Kulturen.

Bain[2] veröffentlichte 1970 Beobachtungen über die Lymphozytenproliferation in gemischten Leukozyten-Kulturen (1 - 2 x 10^3 Leukozyten/ml und 0,35 - 0,55 x 10^3 Lymphozyten/ml, wobei je 2 ml Zellsuspension von zwei verschiedenen Spendern stammten). Die Markierung erfolgte nach fünftägiger Kulturdauer entsprechend der verzögert einsetzenden Stimulation durch allogeneische Lymphozyten.

Die Ergebnisse von Versuchen mit definierter Menge an Radioaktivität (4 µCi) und gleichbleibender Thymidinkonzentration (0,11 µg/Kultur; entspricht einer spezifischen Aktivität von 8,81 Ci/mMol) zeigten eine lineare Erhöhung der Einbaurate in den ersten 6 Stunden; zwischen der 6. und 8. Stunde flachte dann die Kurve der Thymidininkorporation ab.

In einer anderen Versuchsreihe wurden bei konstanter Radioaktivität der Kulturen (4 µCi) die Auswirkungen unterschiedlicher spezifischer Aktivitäten (5,00 - 1,67 - 0,50 - 0,17 und 0,05 Ci/mMol) sowie unterschiedlicher Inkubationszeiten (1 - 4 - 8 und 24 Stunden) untersucht.

Unter Zugrundelegung der Einbaurate an markiertem Thymidin und der spezifischen Aktivität wurde die aktuelle Aufnahme an Gesamtthymidin errechnet.

Bei Inkubationszeiten bis zu 8 Stunden zeigte sich kaum eine Veränderung der Einbaurate; der Totalbetrag an eingebautem Thymidin stieg bei Erhöhung der Konzentration an Thymidin um den Faktor 100 nur auf das Zwei- bis Dreifache an, was annehmen läßt, daß bei der relativ schwachen Stimulation

in der gemischten Leukozyten-Kultur das System bei kurzen Inkubationszeiten trotz der Anwesenheit von Thymidin abbauenden Phagozyten weitgehend mit Thymidin gesättigt ist. Erst bei einer Expositionszeit von 24 Stunden stieg der Thymidineinbau proportional zur Thymidinkonzentration an, was auf fehlende Sättigungsbedingungen und daher nicht mehr proportionalen Einbau in Abhängigkeit von dem Ausmaß der Stimulation bei langen Inkubationszeiten hindeutet.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen zur Frage des Thymidinabbaues in gemischten Leukozyten-Kulturen. Hierzu wurden 4 µCi einer spezifischen Aktivität von 13,85 Ci/mMol (entspricht 0,07 µg Thymidin/Kultur) für 1, 4, 8, 23 und 30 Stunden zugesetzt. Der Thymidineinbau in die DNA stieg während der ersten 4 Stunden steil an, verlangsamte sich dann etwas und blieb nach 8 Stunden konstant. Dabei nahm die Gesamtmenge an radioaktivem Material im Medium um maximal 2,5 % der totalen Radioaktivität ab, was die Autorin zu dem Schluß veranlaßte, daß der Einbau von Thymidin in die Zellen keine signifikante Rolle für die Limitierung des Betrages an Thymidin, der für die DNA-Synthese zur Verfügung steht, spielt.

Untersuchungen des Überstandes in gemischten Leukozyten-Kulturen, denen zu Anfang und nach 5 Tagen 1,2 µg Thymidin mit einer Aktivität von 2 µCi hinzugefügt wurden, ergaben, daß Thymidin von den Leukozyten abgebaut wird, und zwar zunächst - wenn die Neutrophilen noch lebensfähig sind - gleichmäßig zu Thymin und Dihydrothymin; später - nach Absterben der Neutrophilen, wenn die Suspension nur noch Lymphozyten und Blasten enthält - war in größeren Mengen noch Thymin nachweisbar; die Umwandlung zu Dihydrothymin verlief zu diesem Zeitpunkt viel langsamer.

Sample und Chretien[16] stützten sich bei ihren 1971 publizierten Untersuchungen auf das Vier-Faktoren-Modell von Quastler[15] und Cleaver[3]. Nach diesem Modell wird der Einbau des markierten Thymidins u.a. durch den intrazellulären Thymidinpool und durch die Thymidindegeneration beeinflußt. Das System ist gesättigt, wenn zusätzliches exogenes Thymidin die Inkorporationsrate des Markierungsmittels nicht mehr erhöht.

Es wurden nicht gereinigte PHA-stimulierte Leukozyten-Kulturen (4 ml Zellsuspension, 0,5 x 10^6 Zellen/ml) während eines Kulturintervalls von 48 - 72 Stunden untersucht, wobei die zugesetzte spezifische Aktivität 300 mCi/mMol bzw. in einer anderen Versuchsreihe nur 10 mCi/mMol betrug. Die Konzentration des ^{3}H-Thymidins variierte von 1 x 10^{-7} bis zu 1 x 10^{-4} Mol. Die Inkubationszeiten umfaßten den Zeitraum von einer bis zu 18 Stunden.

Die Experimente brachten folgende Ergebnisse:

Bestimmung optimaler exogener Thymidinkonzentrationen: Bei kurzen Inkubationszeiten (eine bis vier Stunden) stieg der Anteil an eingebautem Thymidin linear mit dem Anstieg der Konzentration des hinzugefügten Thymidins, und zwar bis zur Konzentration von 0,5 x 10^{-4} Mol. Bei höheren Thymidin-Konzentrationen wurde ein Plateau erreicht, was bedeutet, daß das System gesättigt war. Bei längeren Inkubationszeiten als vier Stunden blieb der Anstieg der Kurve der Einbaurate linear, d.h. auch bei höheren Thymidinkonzentrationen konnten keine Sättigungsbedingungen erzielt werden.

Um zu zeigen, wie lange diese optimalen Markierungsbedingungen (Zustand der Sättigung des Systems) aufrecht erhalten werden können, wurden die Ergebnisse einer kontinuierlichen Inkubation (nach einmaliger Beimpfung) mit denjenigen bei akkumulativer Inkorporation verglichen, die aus der Summation von stündlichen Inkorporationsraten bei bekannten Sättigungsbedingungen errechnet wurden.

Bei Inkubationsintervallen bis zu vier Stunden unterschied sich die kontinuierliche nicht signifikant von der akkumulativen Inkorporation. Bei längeren Intervallen als vier Stunden war die Einbaurate bei kontinuierlicher Inkubation zunehmend niedriger als die Einbaurate, die sich durch Summation bei stündlicher Inkubation, über den gleichen Zeitraum verteilt, ergab. Obwohl also die Inkorporation in den kontinuierlichen Kulturen nach einem Zeitraum von vier Stunden nicht mehr maximal war, blieb der Anstieg der Kurve noch bis zu einem Zeitraum von zehn Stunden linear. Die lineare Inkorporation des Markierungsmittels kann deshalb nicht als zuverlässiges Kriterium für optimale Markierungsbedingungen angesehen werden. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, daß die Diskrepanz zwischen dem kontinuierlichen und dem akkumulativen Einbau teilweise durch das spätere Hinzufügen von zusätzlichem ^{3}H-Thymidin zu den kontinuierlich inkubierten Kulturen eliminiert werden konnte, was den Schluß zuläßt, daß die Abnahme der Einbaurate nach vier Stunden in kontinuierlich markierten Kulturen zum Teil durch das Fehlen von sättigenden Konzentrationen an exogenem Thymidin bedingt ist.

Nach dem Vier-Faktoren-Modell bewirkt eine Zunahme der spezifischen Aktivität des exogenen Thymidins einen entsprechenden Anstieg der Einbaurate, solange keine Sättigungsbedingungen vorliegen und solange keine Schädigung der Zellen durch die eingebrachte Strahlung verursacht wird. Um Aussagen über einen etwaigen Strahlenschaden zu erhalten, wurden identische Kulturen mit markiertem Thymidin unterschiedlicher spezifischer Aktivität (10 mCi/mMol bzw. 300 mCi/mMol) wie oben beschrieben inkubiert. Bei der niedrigen Aktivität lag die Einbaurate in den kontinuierlichen Kulturen bei mehr als vierstündiger Inkubation niedriger als bei akkumulativer Inkubation. Bei der um das dreißigfache höheren Aktivität betrug die Einbaurate bei akkumulativer Inkubation das dreißigfache derjenigen, die bei der niedrigen Aktivität erhalten wurde. Bei den kontinuierlichen Kulturen wurden bei dieser hohen Aktivität jedoch zunehmend niedrigere Einbauraten beobachtet, als sie aufgrund der akkumulativen Inkubation zu erwarten gewesen wären. Die Differenz war signifikant bei Inkubationszeiten von mehr als 6 Stunden. Es konnte somit ein schädigender Effekt der inneren Strahlung bei Inkubationszeiten von mehr als 6 Stunden nachgewiesen werden.

Wegen der unterschiedlichen Ausgangssituationen sind alle diese Untersuchungen nur begrenzt miteinander vergleichbar und wegen des Fehlens von Standardbedingungen auch nicht ohne weiteres reproduzierbar.

Im wesentlichen haben uns zwei Gründe bewogen, erneut das Problem möglichst optimaler Markierungsbedingungen für den Einbau von radioaktivem Thymidin in die DNA von stimulierten weißen Blutzellen zu untersuchen:

Einmal bestanden die Zellpopulationen, die Sample und Chretien[16] für ihre 1971 veröffentlichten Untersuchungen benutzten, aus nicht voneinander getrennten weißen Blutzellen. Craddock und Nakai, 1962[5], sowie Cooper und Milton, 1964[4], haben jedoch gezeigt, daß bestimmte Fermente nicht lymphoider Blutzellen Thymidin abbauen und so die aktuelle Thymidinkonzentration in der Kulturflüssigkeit wesentlich beeinflussen. Wir wollten

1) den Versuch unternehmen, optimale Markierungsbedingungen für reine Lymphozyten-Kulturen zu finden, und
2) den Versuch machen, Aussagen über den Einfluß einer standardisierten Menge adhärenter Zellen auf das Erreichen und die Aufrechterhaltung von Sättigungsbedingungen zu finden.

Zum anderen beschäftigten sich die meisten Untersucher lediglich mit weißen Blutzellen, die dem Einfluß unspezifischer Stimulantien wie z.B. PHA ausgesetzt worden waren, obwohl die Stimulation von Lymphozyten auch durch Antigene, durch Lymphozyten eines anderen Spenders sowie durch Antikörper gegen Leukozyten (Schellekens und Eijsvoogel, 1968[17]) möglich ist. Da sich die Reaktion von Lymphozyten auf unspezifische Stimulantien wie z.B. PHA in ihrer Kinetik deutlich von der Reaktion auf Antigene unterscheidet, schien es uns sinnvoll, auch für Antigen-stimulierte Lymphozyten-Kulturen möglichst optimale Markierungsbedingungen festzulegen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Trennung von Lymphozyten und adhärenten Zellen

Das von uns als Ausgangsmaterial für alle Versuche verwandte venöse Blut wurde klinisch gesunden, erwachsenen Spendern entnommen. Für Lymphozyten-Kulturen, die mit Antigen stimuliert werden sollten, wählten wir Spender aus, die auf intrakutane Injektion von 0,1 ml Tuberkulin der Stärke 1 : 10 000 (Tuberkulin "GT" Behringwerke, Marburg) eine positive Hautreaktion zeigten.

Um möglichst reine Lymphozyten-Kulturen zu gewinnen, wurde das früher bereits ausführlich beschriebene Verfahren (Havemann, 1969[7]; Havemann und Bürger, 1971[8]; Sodomann, Schmid und Havemann, 1971[19]) leicht modifiziert. Wir sind dabei wie folgt vorgegangen:

Das Blut wurde in sterilen 40-ml-Reagenzröhrchen aufgefangen, die 800 E konservierungsmittelfreies Heparin (Thrombovetren, Promonta, Hamburg) und 5 ml 6 %iges Dextran (Macrodex, Knoll AG, Ludwigshafen) enthielten. Zum Sedimentieren wurden diese Röhrchen bei 37° C eine Stunde lang in einem Winkel von 45° aufbewahrt. Das die weißen Blutzellen enthaltende Plasma wurde abpipettiert und mit dem gleichen Volumen Hanks-Lösung verdünnt. Außerdem wurden der Suspension 100 E Penicillin und 100 Gamma Streptomycin/ml hinzugefügt.

Die Plasma-Hanks-Mischung wurde unter Vermeidung von Luftblasen schnell auf eine Mantelsäule mit einem inneren Durchmesser von ca. 2 1/2 cm gegeben, die wie folgt präpariert worden war:

Die locker mit Nylon (Leuko-Pak, Fenewal) gestopfte Säule wurde zunächst 20 Minuten lang in fließendem destilliertem Wasser gewaschen, dann mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe getrocknet, mit Silberfolie verschlossen und anschließend 30 Minuten lang bei 150° C sterilisiert. Am Auslauf der wieder abgekühlten Säule wurde ein kurzer Gummischlauch mit einer Klemmvorrichtung zur Regulierung der Tropfenzahl der auslaufenden Zellsuspension angebracht. Vor dem Auftragen der Plasma-Hanks-Mischung wurde die Säule mit etwas Hanks-Lösung angefeuchtet.

Bei dem früher beschriebenen Verfahren enthielten die jeweils gewonnenen Lymphozytensuspensionen Granulozyten in der Größenordnung von 1 - 5 %. Um diesen Anteil an Granulozyten noch weiter zu reduzieren, wurde die Plasma-Hanks-Mischung für 30 Minuten in der Mantelsäule vorinkubiert, damit die adhärenten Zellen (Granulozyten und Makrophagen) ausreichend Gelegenheit hatten, sich an der Nylonwatte zu binden.

Erst dann wurde der Auslauf der Säule geöffnet und auf eine Ausflußgeschwindigkeit von 8 - 15 Tropfen pro Minute (bei dem früheren Verfahren 15 - 30 Tropfen/Min.) reguliert. Nach Passage der Plasma-Hanks-Lösung wurde die Säule mit Hanks-Lösung durchgespült. Die im Säulenauslauf vorhandene Zellsuspension wurde über 10 Minuten bei Zimmertemperatur und 500 g zentri-

fugiert. Die Zellen wurden zweimal mit Hanks-Lösung und einmal mit TC Medium (Difco Labs, Detroit) gewaschen, durch Zentrifugation konzentriert und in einem Hämozytometer gezählt.

Unter Anwendung dieser Methode erhielten wir hoch gereinigte Lymphozytensuspensionen. Der Anteil der Granulozyten betrug in der Regel unter 1 %. Die Vitalität der Lymphozyten (Trypan-Blau-Exclusion) betrug mehr als 95 %.

Die in der Säule verbliebenen adhärenten Zellen wurden mit kalter EDTA-Pufferlösung ausgewaschen und in Zentrifugenröhrchen aufgefangen, denen eine Mischung aus Hanks und menschlichem Serum (15 %) vorgelegt war. Die adhärenten Zellen wurden wie die Lymphozyten zentrifugiert, gewaschen und gezählt. Die bei der Gewinnung der adhärenten Zellen verwendeten Glaswaren waren silikonisiert. Darüber hinaus wurde das Verfahren insofern variiert, als wir während des Waschvorganges der Zellsuspension einige Tropfen menschliches Serum zufügten, um die Agglutination der Zellen zu verhüten. Die eliminierten adhärenten Zellen bestanden zu etwa 80 % aus Granulozyten. Der Rest setzte sich aus Monozyten und Lymphozyten zusammen.

2.2 Ansatz der Lymphozyten-Kulturen

Die Lymphozytensuspension wurde mit TC 199 Medium auf die Konzentration von 1 x 10^6 Lymphozyten/ml eingestellt. Die Suspension enthielt 1 % Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) und 15 % menschliches AB-Serum, das einem bei - 80° C tiefgefrorenem Pool entstammte. Die einzelnen Serumportionen wurden erst unmittelbar vor Verwendung aufgetaut.

In die Kulturröhrchen (Drei- oder Vierfach-Kulturen) wurden zunächst entweder 12,5 µg PHA (6,25 µg) (Difco Labs, Detroit) oder 10 µg (5,0 µg) gereinigtes Proteinderivat von Tuberkulin (konservierungsmittelfreies Tuberkulin, Behringwerke, Marburg), gelöst in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung, vorgelegt. Dann wurden je 1,5 ml bzw. 3,0 ml der Lymphozytensuspension ("kleine" bzw. "große" Kultur) einpipettiert, die zuvor auf 1 x 10^6 Zellen/ml eingestellt worden war.

Ein Teil der Kulturen wurde dann mit 0,5 bzw. 1 ml Medium, welches Serum und Antibiotika im o.a. Verhältnis enthielt, auf 2 ml bzw. 4 ml Gesamtflüssigkeit/Röhrchen aufgefüllt. Den restlichen Kulturröhrchen wurde eine jeweils festgelegte Menge an adhärenten Zellen, suspendiert in 0,5 bzw. 1,0 ml Medium, zugesetzt.

Anschließend wurden die Kulturen in einem begasten Inkubator (5 % CO_2 in Luft, relative Feuchtigkeit 80 %) inkubiert; die Röhrchen standen dabei in einem Winkel von 10 - 20°.

Alle Arbeiten erfolgten unter möglichst sterilen Bedingungen.

2.3 Inkubation mit ^{3}H-Thymidin

^{3}H-Thymidin (spezifische Aktivität: 6,7 Ci/mMol) wurde von NEN Chemicals GmbH bezogen. Die radioaktive Thymidin-Lösung wurde mit "kaltem" Thymidin (aufgelöst in physiologischer Kochsalzlösung, steril filtriert) auf eine spezifische Aktivität von 95 mCi/mMol entsprechend einer Konzentration von $2,1 \times 10^{-3}$ Mol verdünnt. Wurden 0,1 ml dieser Stammlösung zur Zellsuspension (2 ml) hinzugegeben, so ergab sich eine exogene Konzentration an markiertem Thymidin von 10^{-4} Mol pro Kultur. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden durch entsprechende Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung die Thymidinkonzentrationen gleicher spezifischer Aktivität aber niederer Molarität hergestellt.

Die mit PHA stimulierten Kulturen wurden am 3. Tag, die mit Tuberkulin stimulierten Kulturen am 5. Tag mit dem radioaktiv markierten Thymidin inkubiert. Diesen Zeitpunkt wählten wir, da die Lymphozytenreaktion auf PHA am 3. Tag, auf Tuberkulin am 5. Tag am stärksten ist.

Als Inkubationszeit für ^{3}H-Thymidin wurde ein Zeitraum von 4, 12 und 24 Stunden vor dem Abbruch der Kultur gewählt. Die Kulturen eines Versuches wurden zum selben Zeitpunkt (72 Stunden bzw. 120 Stunden) abgebrochen.

2.4 Abbruch der Kulturen, DNA-Extraktion und Messung der Radioaktivität

Der Abbruch der Kulturen, die DNA-Extraktion und die Messung der Radioaktivität erfolgten nach der von Havemann 1969[7)] beschriebenen Methode: die DNA wurde nach vorheriger Extraktion der RNA mit 10 %iger Perchlorsäure bei 65° C extrahiert und die Aktivität von jeweils 0,2 ml des Extraktes in einem Packard Szintillations-Counter bestimmt. Die Resultate wurden als relative Größe in cpm minus background angegeben. Das Ausmaß des Quenches und der Zähleffektivität war für alle Proben gleich groß.

3. RESULTATE

3.1 Sättigungsbedingungen in Phythämagglutinin-stimulierten Kulturen mit gereinigten Lymphozyten mit und ohne Zusatz adhärenter Zellen

Zunächst soll das Ergebnis eines Versuchs aus einer Reihe von Kulturen mit gereinigten Lymphozyten beschrieben werden (siehe Abb. 1), die mit PHA stimuliert wurden. Bei diesem Versuch lag der Anteil von Nicht-Lymphozyten in der Zellsuspension unter 0,3 %.

Wir inkubierten die Kulturen mit ^{3}H-Thymidin-Lösungen gleicher spezifischer Aktivität (95 mCi/mMol). Es wurden unterschiedliche Konzentrationen (2×10^{-6}, 6×10^{-6}, 2×10^{-5}, 6×10^{-5} sowie 10^{-4} Mol/Kultur) von Thymidin verwandt. Die Beimpfung der einzelnen Kulturröhrchen mit dem radioaktiven Material erfolgte am 3. Tag entweder 24 Stunden, 12 Stunden oder 4 Stunden vor dem gemeinsamen Abbruch der Kultur.

Die als Ausdruck der Thymidinaufnahme erhaltenen cpm (counts per minute) zeigten, daß die Einbaurate in den Kulturen unabhängig von der exogenen Thymidinkonzentration (2×10^{-6} - 10^{-4}Mol) war (ausgezogene Linien); mit anderen Worten: Sättigungsbedingungen konnten bereits bei der niedrigsten Konzentration von 2×10^{-6} Mol Thymidin erzielt werden.

Mit zunehmender Inkubationszeit (4, 12, 24 Stunden) mit ^{3}H-Thymidin stieg die Menge des in die DNA eingebauten Thymidins proportional zur Dauer der Inkubationszeit an. Die Sättigungsbedingungen blieben unabhängig von der Inkubationszeit bereits bei einer Thymidinkonzentration von 2×10^{-6} Mol bestehen.

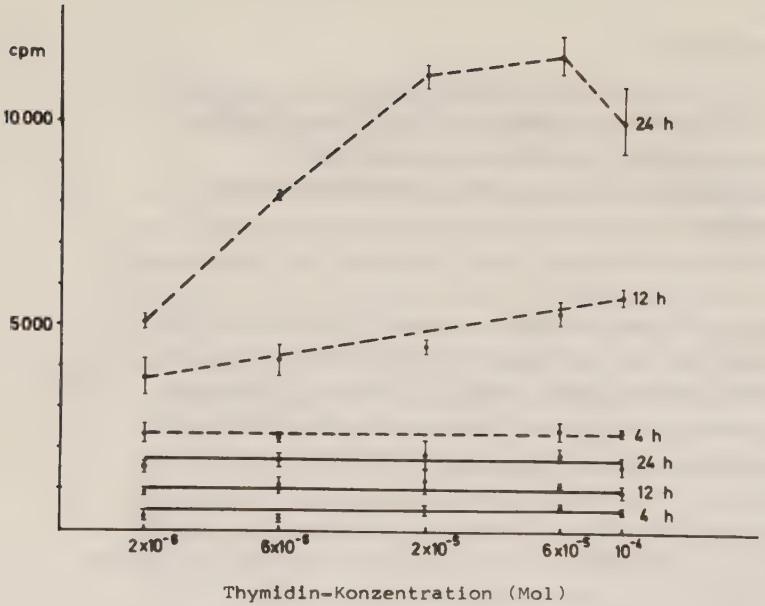

Abb. 1

Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA
(counts per minute, gemessen in 1/10 des DNA-Extraktes)

von PHA-stimulierten Kulturen
aus reinen Lymphozyten (1,5 x 10^{6}/Kultur) - durchgehende Linien

und in PHA-stimulierten Kulturen
mit Lymphozyten (1,5 x 10^{6}/Kultur) plus adhärente Zellen
(1,2 x 10^{6}/Kultur = rd. 45 %) - gestrichelte Linien

Die Kulturen wurden am 3. Tag mit ^{3}H-Thymidin
zunehmender Konzentration aber gleicher
spezifischer Aktivität (95 mCi/mMol) für
4, 12 und 24 Stunden inkubiert.
Gesamt-Thymidin-Konzentration: 2 x 10^{-6} - 10^{-4} Mol (Ordinate).

Die Punkte repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standard-
abweichung der in Vierergruppen angelegten Kulturen.

Der Einbau in den nicht stimulierten Kontroll-
Kulturen lag jeweils niedriger als 50 cpm.

Im zweiten Teil des Versuchsansatzes wurden der gereinigten Lymphozytensuspension rd. 45 % adhärente Zellen zugesetzt (siehe Abb. 1, gestrichelte Linien). Dabei ergaben sich wesentliche Veränderungen des Thymidineinbaues: gegenüber den Kulturen mit hochgereinigten Lymphozyten stieg in allen mit adhärenten Zellen versetzten Kulturen die Einbaurate je nach Inkubationszeit um das fünf- bis zehnfache an. Dabei zeigte die Kurve der Vier-Stunden-Inkubation noch keine wesentliche Abweichung von einer zur X-Achse parallelen Linie. Die Zwölf-Stunden-Inkubationskurve stieg mit zunehmender Thymidinkonzentration jedoch bereits deutlich an, ohne ein Plateau zu erreichen. Noch offensichtlicher war die Steigerung der Einbaurate in Abhängigkeit von der Thymidinkonzentration bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden: Konzentrationen von 2×10^{-6} - 2×10^{-5} Mol führten zu einem linearen Anstieg der Thymidininkorporation in die DNA. Bei höheren Konzentrationen (6×10^{-5} Mol) kam es zu einer Abflachung und schließlich zu einem Abfall der Einbaurate (2×10^{-5} Mol).

Typisch für Experimente mit sogenannten "gereinigten" Lymphozytensuspensionen sind die Ergebnisse, die in Abb. 2 wiedergegeben sind.
Bei diesen Versuchen handelte es sich um eine Lymphozytensuspension, die 4 % adhärente Zellen enthielt, ein Prozentsatz an verbleibenden adhärenten Zellen, wie er üblicherweise bei der Methode der Lymphozytenreinigung mit Nylonwatte (ohne die hier eingeführte Modifikation) erreicht wird.

Bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden zeigen die Ergebnisse wiederum bereits bei der niedrigsten Thymidinkonzentration von 2×10^{-6} Mol Sättigungsbedingungen, d.h. eine weitere Erhöhung der Thymidinkonzentration führt nicht zu einem Anstieg der Einbaurate. Dagegen ergab sich bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden zunächst ein Anstieg der Thymidinaufnahme bis zu einer Konzentration von 2×10^{-5} Mol; eine weitere Erhöhung der Thymidinkonzentration führte dann nicht zu einer weiteren Erhöhung der Aufnahme.

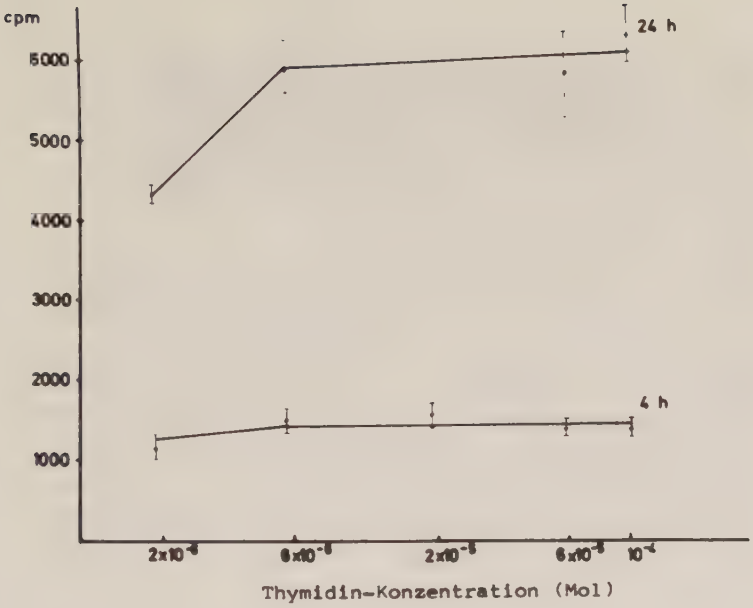

Abb. 2

Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA
(counts per minute, gemessen in 1/10 des DNA-Extraktes)

von PHA-stimulierten Kulturen
mit Lymphozyten (1,5 x 10^{6}/Kultur)
plus adhärente Zellen (7,5 x 10^{4}/Kultur = 4 %).

Die Kulturen wurden am 3. Tag mit ^{3}H-Thymidin
unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 1
inkubiert.

Die Punkte repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standard-
abweichung der in Dreiergruppen angelegten Kulturen.

Vergleicht man das Erreichen der Sättigungsbedingungen in Abb. 1 und 2, so wurden diese bei einer 24stündigen Inkubation bei 0,3 % adhärenten Zellen bei 2×10^{-6} Mol, bei 4 % adhärenter Zellen bei 6×10^{-6} Mol und bei rd. 45 % adhärenter Zellen erst bei 2×10^{-5} Mol Thymidin erreicht.

3.2 Sättigungsbedingungen in Tuberkulin-stimulierten Kulturen mit gereinigten Lymphozyten mit und ohne Zusatz adhärenter Zellen

Die Abb. 3 faßt die Ergebnisse verschiedener Experimente mit Tuberkulin-stimulierten Lymphozyten zusammen. Die Versuche wurden in ähnlicher Weise wie diejenigen mit PHA-stimulierten Lymphozyten ausgeführt. Die Inkubation mit dem radioaktiv markierten Thymidin erfolgte aus den bereits genannten Gründen jedoch erst am 5. Tag nach Kulturansatz. Die Lymphozytensuspensionen enthielten durchschnittlich 1 % adhärente Zellen.

Die Änderungen der Thymidinkonzentrationen hatten keinen Einfluß auf die Einbaurate. Die Kulturen mit der niedrigsten Konzentration an Thymidin (2×10^{-6} Mol) zeigten praktisch die gleiche Einbaurate wie die Kulturen mit der fünfzigmal höheren Thymidinkonzentration (10^{-4} Mol).

Parallel zu der Inkubationszeit mit dem Isotop (4, 12, 24 Stunden) kam es zu einem Anstieg der Thymidininkorporation, ohne daß jedoch die bereits bei der niedrigsten Thymidinkonzentration erzielten Sättigungsbedingungen beeinflußt wurden.

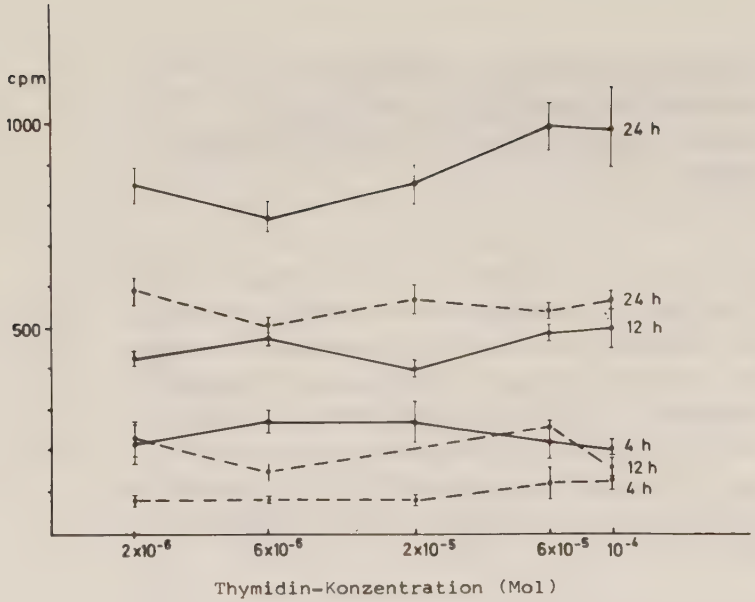

Abb. 3

Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA
(counts per minute, gemessen in 1/10 des DNA-Extraktes)

von Tuberkulin-stimulierten Kulturen
aus reinen Lymphozyten (1,5 x 10^{6}/Kultur) - gestrichelte Linien

und in Tuberkulin-stimulierten Kulturen
mit Lymphozyten (1,5 x 10^{6}/Kultur) plus adhärente Zellen
(0,45 x 10^{6}/Kultur = 30 %) - durchgehende Linien.

Die Kulturen wurden am 5. Tag mit ^{3}H-Thymidin
unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 1
inkubiert.

Die Punkte repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standard-
abweichung der in Dreiergruppen angelegten Kulturen.

Die Zugabe von 30 % adhärenten Zellen erbrachte zwar einen zwei- bis dreifach höheren Einbau von Thymidin in die Zellen; wesentliche Abweichungen von einer zur X-Achse parallelen Linie waren jedoch nicht zu verzeichnen. Ein mäßiger Anstieg der Kurve bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden war statistisch nicht signifikant. Dies bedeutet, daß bei Tuberkulin-stimulierten Lymphozyten-Kulturen die Anwesenheit auch größerer Mengen adhärenter Zellen keinen Einfluß auf das Erreichen und die Aufrechterhaltung von Sättigungsbedingungen hatte.

4. DISKUSSION

Bei der Stimulation von Lymphozyten in vitro kommt der Frage der Reproduzierbarkeit - wie bei allen wissenschaftlichen Experimenten - eine große Bedeutung zu. Quantitative Vergleiche der in der Vergangenheit unternommenen Arbeiten auf diesem Gebiet sind aber wegen unterschiedlicher Ausgangsbedingungen der einzelnen Untersucher nur schwer möglich. Es erscheint daher dringend notwendig, als gemeinsame Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen für jedes experimentelle System - hier: spezifische und unspezifische Stimulation von Lymphozyten-Kulturen, Vorhandensein oder Fehlen adhärenter Zellen - jeweils die spezifische Aktivität, die Expositionszeit, die Thymidinkonzentration - kurz: möglichst optimale Markierungsbedingungen - festzulegen.

Es herrscht heute Einigkeit darüber, daß die Bestimmung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA die angemessenste Methode ist, um die Lymphozytenreaktion auf ein Stimulans zu bestimmen. Wie in früheren Studien (Sample und Chretien, 1971)[16] gezeigt werden konnte, spiegelt die Aufnahmerate des markierten Thymidins in die Zelle die aktuelle Rate der DNA-Synthese jedoch nur dann exakt wider, wenn die Markierungsbedingungen so gewählt werden, daß der Einfluß des endogenen Thymidins der Zellen ausgeschaltet ist, d.h. wenn das System während der ganzen Inkubationszeit mit exogenem Thymidin gesättigt ist. Diese Voraussetzungen waren in den von Sample und Chretien unternommenen Versuchen mit Leukozyten-Kulturen für einen Zeitraum von vier Stunden Inkubationszeit bei relativ hoher Thymidinkonzentration erfüllt.

Wie wir mit unserer Arbeit zeigen konnten, lassen sich Sättigungsbedingungen in PHA-stimulierten Lymphozyten-Kulturen mit bei weitem geringeren Thymidinkonzentrationen erreichen und auch über 24 Stunden aufrecht erhalten, wenn hochgereinigte Lymphozytensuspensionen verwendet werden. Enthalten die Lymphozytensuspensionen dagegen einen kleinen Anteil von adhärenten Zellen (z. B. 4 %), so werden Sättigungsbedingungen zwar - wenn auch bei leicht höheren Thymidinkonzentrationen - bereits bei vierstündiger Inkubationszeit erreicht, sie lassen sich jedoch nicht über 24 Stunden aufrecht erhalten.

Wird andererseits den Lymphozyten-Kulturen ein hoher Prozentsatz von adhärenten Zellen zugegeben, so beobachtet man zwei wesentliche Einflüsse:

Einmal steigt die Gesamtinkorporation an Thymidin in die Zellen um den Faktor Fünf bis Zehn an. Dies ist zum einen eine Bestätigung früherer Ergebnisse, wonach bei Anwesenheit von adhärenten Zellen der Thymidineinbau in PHA-stimulierten Kulturen deutlich aktiviert wird (Levis und Robbins, 1970)[10].

Zum andern gibt es Veränderungen im Einbaumuster: Sättigungsbedingungen werden bei einer mehr als vierstündigen Inkubationszeit nicht mehr erreicht; vielmehr zeigt die Inkorporationsrate bei einer Inkubation von mehr als vier Stunden eine klare Abhängigkeit von der anfänglichen Thymidinkonzentration.

Als Erklärung für dieses Phänomen können mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

Da bei Anwesenheit von adhärenten Zellen in Lymphozyten-Kulturen der Stimulationseffekt von PHA stärker wird als in reinen Lymphozyten-Kulturen, wird mehr Thymidin für die DNA-Synthese verbraucht. Der exogene Thymidin-Pool verringert sich entsprechend schneller. Wie Hartog et al. 1967[6)] zeigen konnten, stellt jedoch das in die DNA eingebaute Thymidin nur einen kleinen Betrag des gesamten exogenen Thymidin-Pools dar, so daß dieser Mechanismus für das Nichterreichen von Sättigungsbedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Es ist bekannt, daß adhärente Zellen Enzyme enthalten, die Thymidin abbauen. Das Vorhandensein derartiger Enzymaktivitäten in Homogenaten und Überständen von normalen und leukämischen Leukozyten wurde von Marsh und Perry 1964[11)] und von Cooper und Milton 1964[4)] belegt. Ähnliche Aktivitäten fanden Milton et al. 1965[13)] auch in PHA-stimulierten Lymphozyten, wenn auch in weit geringerem Ausmaß.

Da wir in reinen Lymphozyten-Kulturen keine Anzeichen für einen extensiven Thymidinabbau fanden - Sättigungsbedingungen konnten konstant über 24 Stunden bei allen von uns verwandten Thymidinkonzentrationen aufrecht erhalten werden -, reichten offenbar die aus den Lymphozyten allein stammenden Thymidin-abbauenden Fermente nicht aus, um den exogenen Thymidin-Pool signifikant zu beeinflussen. Bei der o. a. Studie von Milton et al. betrug die Lymphozytenkonzentration der jeweiligen Kulturen nahezu das Zehnfache.

Um aus den vorerwähnten Gründen bei Anwesenheit von adhärenten Zellen in Lymphozyten-Kulturen einen für Sättigungsbedingungen ausreichenden exogenen Thymidin-Pool zu schaffen, müßte eine so hohe Thymidinkonzentration gewählt werden, daß

a) bei einer spezifischen Aktivität unter der von uns gewählten Größenordnung der Verdünnungseffekt durch nicht markiertes Thymidin wahrscheinlich zu groß würde, als daß die meßbaren cpm noch ein exaktes Maß für den tatsächlichen Einbau von Thymidin in die DNA darstellten,

b) bei einer höheren spezifischen Aktivität mit großer Wahrscheinlichkeit Strahlenschäden in der Zellpopulation zu erwarten wären.

Aus diesem Grunde ist eine mittlere spezifische Aktivität in einer Größenordnung von 100 mCi/mM bei gleichzeitig kurzer Inkubationszeit (vier Stunden) für das von uns gewählte System die optimale Voraussetzung, um bei unterschiedlicher Stimulation (z. B. unterschiedliche Dosen des Mitogens) eine der Stimulation entsprechende Einbaurate zu garantieren.

Auch in Tuberkulin-stimulierten Lymphozyten-Kulturen konnten wir einen positiven Einfluß von adhärenten Zellen auf die absolute Höhe des in die DNA eingebauten Thymidins beobachten. Wir konnten damit bereits früher gemachte Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (Oppenheim, Leventhal und Hersh, 1968[14]; Hersh und Harris, 1968[9]; Seeger und Oppenheim, 1970[18]) bestätigen.

Im Gegensatz zu den mit PHA stimulierten Kulturen hatte das Vorhandensein von adhärenten Zellen in den mit Tuberkulin stimulierten Lymphozyten-Kulturen jedoch keinen Einfluß auf die Thymidinkonzentrationen, die zum Erreichen von Sättigungsbedingungen notwendig waren. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Tatsache, daß die Kulturen erst am 5. Tag nach dem Ansatz mit dem radioaktiven Thymidin inkubiert wurden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Granulozyten, die bekanntlich eine kürzere Lebensdauer als Lymphozyten besitzen, zum großen Teil bereits abgestorben; einzelne möglicherweise noch vorhandene adhärente Zellen bzw. die für den Thymidinabbau verantwortlichen frei gewordenen Enzyme waren bei längerer Inkubationszeit (24 Stunden) noch gering wirksam, sie waren jedoch ohne Einfluß bei kurzen Inkubationszeiten.

Wenn auch, wie oben diskutiert, dem Verbrauch des exogenen Thymidin-Pools durch Einbau in die DNA nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt, so ist doch nicht auszuschließen, daß auch die wesentlich geringere und protrahiert verlaufende DNA-Synthese in Antigen-stimulierten Kulturen im Vergleich zu mitogen-stimulierten Kulturen eine Rolle bei der früheren Sättigung des Systems spielen könnte.

Wir sind der Ansicht, daß Sättigungsbedingungen in Tuberkulin-stimulierten Lymphozyten-Kulturen mit niedrigeren Thymidinkonzentrationen als mit PHA-stimulierten Leukozyten- (Sample und Chretien, 1971[16]) bzw. Lymphozyten-Kulturen (Schellekens und Eijsvoogel, 1968[17]) erreichbar sind, und daß Sättigungsbedin-

gungen sogar während einer Inkubationszeit von 24 Stunden aufrecht erhalten werden können. Dagegen ist das Erreichen und die Aufrechterhaltung solcher Bedingungen in PHA-stimulierten Lymphozyten-Kulturen davon abhängig, ob und in welcher Konzentration in diesen Kulturen adhärente Zellen vorhanden sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch gemacht, Faktoren zu definieren, die bei der Markierung von spezifisch oder unspezifisch stimulierten Lymphozyten-Kulturen mit radioaktivem Thymidin beachtet werden müssen, wenn die Thymidininkorporation in die DNA der Lymphozyten ein Maß für die tatsächliche DNA-Syntheserate der Zellen und somit auch für das Ausmaß der Lymphozytenproliferation darstellen soll. Insbesondere wurde der Einfluß von in Lymphozyten-Kulturen enthaltenen adhärenten Zellen auf das Erreichen und die Aufrechterhaltung von Sättigungsbedingungen für Thymidin untersucht.

In stimulierten Kulturen mit hochgereinigten Lymphozyten konnten wir Sättigungsbedingungen bei niedrigeren Thymidinkonzentrationen und längeren Inkubationszeiten erzielen, als bisher beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von adhärenten Zellen in mitogen-stimulierten Lymphozyten-Kulturen den exogenen Thymidinpool offenbar so stark beeinflußt, daß bei längeren Inkubationszeiten keine Sättigungsbedingungen mehr erreicht werden können. Eine solche Beeinflussung des exogenen Thymidinpools ließ sich in Tuberkulin-stimulierten Lymphozyten-Kulturen auch bei Anwesenheit von größeren Mengen adhärenter Zellen nicht nachweisen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1) Aisenberg, C.:
Quantitative estimation of the reactivity of normal and Hodgkin's disease lymphocytes with thymidine-2-^{14}C.
Nature (Lond.) 205 (1965), 1235

2) Bain, Barbara:
Tritiated-thymidine uptake in mixed leucocyte cultures: effect of specific activity and exposure time.
Clin. exp. Immunol. 6 (1970), 255 - 262

3) Cleaver, J.E.:
Thymidine metabolism and cell kinetics.
Hrsg. A. Neuberger und E.L. Tatum
North-Holland Publishing Company,
Amsterdam (1967), 70

4) Cooper, E.H. and Milton, J.D.:
The incorporation and degradation of pyrimidine DNA precursors by human leucocytes.
Brit. J. Cancer 18 (1964), 701 - 713

5) Craddock, C.G. and Nakai, G.S.:
Leukemie cell proliferation as determined by in vitro deoxyribonucleic acid synthesis.
J. clin. Invest. 41 (1962), 360 - 369

6) Hartog, M.; Cline, M.J. and Grodsky, G.M.:
The response of human leucocyte cultures to stimulation by tuberculin and phytohaemagglutinin measured by the uptake of radioactive thymidine.
Clin. exp. Immunol. 2 (1967), 217 - 228

7) Havemann, K.:
Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel in Lymphozytenkulturen von Gesunden und Patienten mit Erkrankungen des lymphatischen Systems. Methodik und kinetische Untersuchungen bei Gesunden.
Z. exp. Med. 151 (1969), 138 - 162

8) Havemann, K. und Bürger, S.:
In vitro studies on the release of mitogenic factor by sensitized human lymphocytes.
Europ. J. Immunol. 1 (1971), 285 - 290

9) Hersh, E.M. and Harris, J.E.:
Macrophage-lymphocyte interaction in the antigen induced blastogenic response of human peripheral blood leukocytes.
J. Immunol. 100 (1968), 184 - 194

10) Levis, W.R. and Robbins, J.H.:
Effect of glass-adherent cells on the blastogenic response of 'purified' lymphocytes to phyto-haemagglutinin.
Exp. Cell Res. 61 (1970), 153 - 158

11) Marsh, J.C. and Perry, S.:
Thymidine catabolism by normal and leukemic human leukocytes.
J. clin. Invest. 43 (1964), 267 - 278

12) Michalowski, A.:
Time-course of DNA synthesis in human leukocyte cultures.
Exp. Cell Res. 32 (1963), 609

13) Milton, J.D.; Cooper, E.H. and Halle-Panneko, D.:
La dégradation de la thymidine par les lymphocytes transformés.
Rev. franç. Etud. clin. biol. 10 (1965), 419

14) Oppenheim, J.J.; Leventhal, B.G. and Hersh, E.M.:
The transformation of colum-purified lymphocytes with non-specific and specific antigenic stimuli.
J. Immunol. 101 (1968), 262 - 270

15) Quastler, H.:
Actions chimiques et biologiques des radiations.
Hrsg. Haissinby, Masson, Paris (1963), 147

16) Sample, W.F. and Chretien, P.B.:
Thymidine kinetics in human lymphocyte transformation: determination of optimal labelling conditions.
Clin. exp. Immunol. 9 (1971), 419 - 432

17) Schellekens, P.T.A. and Eijsvoogel, V.O.:
Lymphocyte transformation in vitro.
I. Tissue culture conditions and quantitative measurements.
Clin. exp. Immunol. 3 (1968), 571 - 584

18) Seeger, R.C. and Oppenheim, J.J.:
Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in antigen-induced transformation of lymphocytes.
J. exp. Med. 132 (1970), 44 - 65

19) Sodomann, C.P.; Schmidt, M. und Havemann, K.:
In-vitro-Untersuchungen über den Einfluß des Migrations-Inhibitions-Faktors (MIF) von Lymphocyten auf periphere Blutmonocyten und Granulocyten beim Menschen.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 77 (1971), 384 - 389

20) Wolberg, W.H.:
Alternative pathways for DNA-thymine synthesis in stimulated leucocytes.
Clin. exp. Immunol. 8 (1971), 177 - 186

21) Xeros, N.:
Deoxyriboside control and synchronization of mitosis.
Nature (Lond.) 194 (1962), 682 - 683

7. SCHLUSSWORT

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Havemann herzlich danken, auf dessen Anregung und unter dessen Leitung die beschriebenen Untersuchungen durchgeführt wurden.

Darüber hinaus bin ich Herrn Dr. med. M. Horvat, damals wissenschaftlicher Mitarbeiter im hämatologischen Labor von Professor Havemann, zu großem Dank verpflichtet; er hat mir während der ganzen Zeit, in der ich die experimentellen Arbeiten durchführte, unentwegt hilfreich zur Seite gestanden.

Ebenso danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für ihre bereitwillige Unterstützung, ohne die sich meine Arbeit sehr viel schwieriger gestaltet hätte.

8. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren
folgende Professoren und Dozenten/Dozentinnen:

in Heidelberg:

Alexandridis, Altmann, Andres,
Brauss, Doerr, Dudel, Duspiva, Ferner,
Goerttler, Groß, Hardegg, Heep,
Kantner, Kutscher, Lassen, Lau, Linder,
Meyer, Pfleiderer, Poch, Reinbach,
Schaefer, Schettler, Schildknecht,
Tellenbach, Trautwein, Ule, Vogel,
Wagener, Walch, Wendt;

in Marburg:

Amon, Barthelmai, Berendes, Bommer, Buchholz, Busch,
Deppe, Diedrich, Eissner, Exner, Friederich, Graul,
Hardewig, Havemann, Heuser, Hort,
Jacob, Keil, Linneweh, Martini, Nesswetha, Reim,
Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Strohmeyer,
Willenbockel, Uhlarik.

9. LEBENSLAUF

Geboren am 1. 1. 1942 in Völklingen/Saar
als zweites von fünf Kindern der Eheleute
Eduard Kallenbrunnen, Postbetriebsassistent,
und Susanne geb. Karrenbauer

1948 - 1956	Besuch der kath. Volksschule in Völklingen-Wehrden
1956 - 1958	Anlernling bei der Kreissparkasse Saarbrücken; Besuch der Kaufmännischen Berufsschule in Saarbrücken
1958	Bürogehilfinnenprüfung
1958 - 1963	Stenotypistin bei verschiedenen saarländischen Firmen
1963	sechsmonatige Tätigkeit als Kindermädchen in den U.S.A.
1964 - 1965	Sekretärin bei der Saar-Union Versicherungsgesellschaft, Saarbrücken
1965 - 1968	Vorstandssekretärin bei der Rhenania-Lebensversicherung, Saarbrücken
1965 - 1968	Besuch des Staatlichen Abendgymnasiums in Saarbrücken
Febr. 1968	Abitur
Sommersem. 1968	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Heidelberg; während des Studiums zunächst staatliche Förderung; später Förderung durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes
1969	Vorphysikum in Heidelberg
1970	Physikum in Heidelberg
bis 1971	zwei klinische Semester an der Universität Heidelberg
Wintersem. 1971	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Marburg
Dez. 1973	Ärztliche Prüfung in Marburg
1974	Medizinalassistentenzeit im Kreiskrankenhaus Ziegenhain, Schwalmstadt/Hessen (sechs Monate Chirurgie, sechs Monate Innere Medizin)
seit 1. 2. 1975	Assistenzärztin der Städtischen Krankenanstalten Winterberg, Saarbrücken, Zentrum für Kinderheilkunde